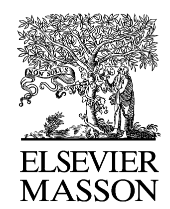



Médecine et maladies infectieuses 37 (2007) 710–715


http://france.elsevier.com/direct/MEDMAL/

Revue générale

Diagnostic du paludisme d'importation en France

Diagnosis of imported malaria in France

J.J. De Pina[a,*], E. Garnotel[a], P. Hance[a], S. Vedy[a], C. Rogier[b], M. Morillon[a]

[a] *Laboratoire de biologie clinique, HIA Laveran, 13000 Marseille, France*
[b] *Unité de recherche en biologie et épidémiologie parasitaire (URBEP), IMTSSA, Marseille, France*

Reçu et accepté le 11 septembre 2007
Disponible sur internet le 23 octobre 2007

Résumé

Les biologistes français sont souvent confrontés au diagnostic du paludisme d'importation. Les outils diagnostiques pouvant être utilisés au laboratoire, différent par leurs technologies, leurs sensibilités, leurs interprétations et leurs coûts. Leur stratégie d'emploi peut être hiérarchisée en fonction des moyens techniques disponibles, et de l'habitude du biologiste à rechercher le plasmodium.
© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

The need for diagnosis of imported malaria is frequent in France. Diagnosis biological tools are different, according methods, sensitivity, interpretation and costs. Strategies for their use could be stratified according locally available methods, and experience of the practician.
© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Paludisme d'importation ; Diagnostic biologique

Keywords: Imported malaria; Biological diagnosis

La France est, parmi les pays industrialisés, celui qui compte le plus de cas de paludisme d'importation (7000 cas par an) [1]. Maladie potentiellement mortelle en l'absence d'une prise en charge rapide, son diagnostic est une véritable urgence. Le biologiste français a donc un rôle crucial à jouer dans le diagnostic du paludisme. Il doit pouvoir conclure à la présence ou à l'absence du parasite, préciser l'espèce, quantifier la parasitémie. Le biologiste dispose de nombreux outils. Lesquels utiliser ? Leur emploi peut-il être hiérarchisé ?

Avant de répondre à ces questions, il est important de bien connaître les différentes techniques utilisables.

1. Techniques disponibles

Ces techniques peuvent être séparées en trois grands groupes : celles nécessitant un microscope, celles qui reposent sur la recherche d'antigènes circulants, et celles qui font appel à la biologie moléculaire.

1.1. Diagnostic microscopique

1.1.1. Frottis sanguin

Il est réalisé à partir d'un prélèvement au bout du doigt, ou à partir d'un prélèvement veineux sur anticoagulant (EDTA). 1 à 1,5 µl de sang est déposé sur une lame en verre parfaitement nettoyée et dégraissée. Le dépôt est ensuite étiré à l'aide d'une

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : jjdepina@free.fr (J.J. De Pina).

0399-077X/$ - see front matter © 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.
doi:10.1016/j.medmal.2007.09.001

autre lame. Il est coloré au May-Grünwald-Giemsa (pH : 7,2) ou par une coloration rapide de type RAL 555. Le frottis coloré est ensuite observé à l'objectif 100, à l'immersion. Cette technique est considérée comme la technique de référence [2,3]. Elle permet le diagnostic positif du paludisme en objectivant un parasite intraérythrocytaire.

L'étude morphologique des parasites et des hématies parasitées permet le diagnostic d'espèce.

Enfin, cette technique est utile pour le calcul des parasitémies. Elle est généralement estimée en pourcentage d'hématies parasitées. En connaissant le nombre de globules rouges par µl, elle peut être exprimée en parasites/µl.

L'observation du frottis sanguin peut apporter des arguments indirects d'infection palustre : appréciation semi-quantitative de la thrombopénie (moins de dix plaquettes par champ à l'objectif 100 à l'immersion), présence éventuelle de lymphocytes hyperbasophiles.

Cette technique est peu coûteuse en moyens et en réactifs (0,03 à 0,7 euro) [4], mais elle nécessite un personnel formé. L'examen des frottis peut être long, puisqu'il faut examiner 100 à 200 champs microscopiques (soit 15 à 40 minutes selon l'expérience du lecteur) avant de pouvoir conclure à l'absence de parasite sur le frottis.

La sensibilité de ce test est estimée à 200 hématies parasitées par µl.

Les patients non immuns ayant plus ou moins bien suivi une chimioprophylaxie, ont souvent une parasitémie proche ou inférieure à ce seuil. Le diagnostic d'espèce devient donc difficile et le diagnostic positif doit souvent passer par des techniques de concentration.

1.1.2. Techniques de concentration

1.1.2.1. Goutte épaisse. Cette technique repose sur les mêmes prélèvements et colorations que le frottis sanguin. Mais, la quantité de sang observé est de 20 à 30 fois plus élevée. Son seuil de sensibilité est de l'ordre de 10 à 20 hématies parasitées par µl. Elle nécessite un temps de séchage de quelques minutes avec un four à micro-onde [5], une étuve ou un sèche-cheveux. Avant coloration, une étape d'hémolyse ou de déshémoglobinisation est nécessaire. Ces deux étapes peuvent altérer l'aspect des parasites [2]. L'étude morphologique des hématies parasitées est ici impossible. Il est donc très difficile, et quelquefois impossible, de faire un diagnostic d'espèce.

Le calcul de la densité parasitaire est possible soit en rapportant le nombre de parasites observés à une quantité de sang calibrée, ou au nombre de leucocytes vus sur la lame.

Là encore les coûts sont faibles, mais cette technique, plus encore que le frottis, nécessite du personnel formé.

1.1.2.2. Microscopie et fluorescence : le QBC™ Malaria Test [6]. Commercialisée par la société Becton-Dickinson, cette technique repose sur la coloration fluorescente des acides nucléiques par l'acridine orange.

L'échantillon sanguin, prélevé par piqûre au bout du doigt ou sur tube avec anticoagulant, est monté dans un tube capillaire spécifique, dont une partie de la paroi interne est recouverte d'acridine orange. Après centrifugation, le tube doit être examiné avec un microscope équipé d'une lumière UV, ou avec un microscope classique équipé d'un objectif à immersion relié à une source de lumière froide par une fibre optique, cette lumière étant modifiée par un filtre dichroïque.

Technique très rapide, ne nécessitant que quelques minutes, très simple à mettre en œuvre, elle nécessite là encore du personnel formé. Un biologiste ne peut lire correctement un QBC™ Malaria Test que s'il sait parfaitement lire un frottis sanguin. Cette limite a souvent été occultée et le test, accusé d'être de lecture difficile, a été peu diffusé. Ce procédé représente la technique microscopique la plus sensible (un à cinq parasites par µl).

Elle ne permet ni le diagnostic d'espèce, ni le calcul de la densité parasitaire.

Son coût est élevé (1,5 euro par test).

La société Becton Dickinson a arrêté la commercialisation de l'ensemble de sa gamme QBC™ Malaria fin 2006. La distribution de cette gamme a été reprise par la société Seroa, installée à Monaco.

1.2. Tests de détection antigénique rapide ou tests immunochromatographiques

Ces tests permettent la détection d'antigènes palustres après migration d'un prélèvement de sang périphérique sur une membrane de nitrocellulose. Les antigènes sont capturés par des anticorps monoclonaux préalablement fixés sur cette membrane. Cette capture est ensuite révélée par de nouveaux anticorps monoclonaux couplés à une particule colorée révélatrice (or colloidal ou sélénium) [7,8]. Ces techniques nécessitent une dizaine de minutes pour leur réalisation. Leurs coûts varient de 1,5 à 3 euros.

Selon les tests (Tableau 1), différents anticorps sont utilisés.

1.2.1. Il peut s'agir d'anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques d'espèce

1.2.1.1. Spécifiques de Plasmodium falciparum

- L'HRP2 (*histidin rich protein* 2) : C'est une glycoprotéine présente à la surface du globule rouge parasité. Elle est également secrétée par les formes asexuées et les jeunes gamétocytes [9]. Cette glycoprotéine peut persister dans le sang périphérique plus de 15 jours après disparition des parasites [10–12]. La positivité de cette recherche nécessite plus de 100 parasites par µl [13–15], voire 300 parasites par µl [16]. Des faux-positifs ont été décris en présence de facteurs rhumatoïdes [17–19]. Des faux-négatifs pourraient être dus à des mutations du gène codant pour l'HRP2 [2] ou à la présence d'anticorps anti-HRP2 [20].
- La *P. falciparum* LDH (lactate déshydrogénase) : enzyme glycolytique du parasite, son activité est là encore détectée aux stades sexués et asexués [21]. Cette activité est proportionnelle à la parasitémie [22–24]. La sensibilité de détec-

Tableau 1
Tests de recherche d'antigènes palustres disponibles en France
Table 1
Rapid diagnostic test for malaria (Ag detection) available in France

Test	Palutop	Core Malaria Pf	Kat-Quick Malaria	Now ICT Malaria	Optimal IT	Palutop+4	Core Malaria Pan/Pv/Pf
Distributeur	All Diag	Core diagnosis	AES	Binax	Diamed	All Diag	Core diagnosis
Nombre d'antigènes détectés	1	1	1	2	2	3	3
Antigènes détectés	HRP2	HRP2	HRP2	HRP2 Aldolase commune	*P. falciparum* LDH LDH commune	HRP2 *P. vivax* LDH LDH commune	HRP2 *P. vivax* LDH LDH commune
Espèce(s) détectée(s)	*P. falciparum*	*P. falciparum*	*P. falciparum*	*P. falciparum* Autres espèces[a]	*P. falciparum* Autres espèces[a]	*P. falciparum* *P. vivax* Autres espèces[a]	*P. falciparum* *P. vivax* Autres espèces[a]

[a] Pour tous, la détection de *Plasmodium ovale* présente un défaut de sensibilité.

tion est identique à celle de l'HRP2 [8]. La *P. falciparum* LDH disparaît plus rapidement que l'HRP2.

1.2.1.2. Spécifiques de Plasmodium vivax *: la* P. vivax *LDH*. Son seuil de détection semble là encore identique à celui de l'HRP2 et à la *P. falciparum* LDH à savoir 100 à 300 parasites par µl.

1.2.2. Il peut s'agir d'anticorps présentant des réactivités croisées pour les quatre espèces

1.2.2.1. Anticorps anti-aldolases. Ces anticorps sont dirigés contre des enzymes du cycle glycolytique du parasite. Pour *P. falciparum*, la sensibilité de cet anticorps est inférieure à celle des anticorps spécifiques (anticorps anti-*P. falciparum* LDH, ou anti-HRP2) [8,25,26]. Pour *P. vivax* la sensibilité est moindre [8,25,26]. Elle est inférieure à 50 % pour *Plasmodium ovale* et *Plasmodium malariae* [8,27–31]. Pour *P. ovale* ce manque de sensibilité semble indépendant de la parasitémie [30].

1.2.2.2. Anticorps anti- pLDH. Ces anticorps sont dirigés contre des isomères différents des LDH spécifiques de *P. falciparum* et de *P. vivax*. La sensibilité vis-à-vis des quatre espèces est comparable à celle des anticorps anti-aldolase [8, 27–31].

1.3. Techniques de biologie moléculaire

Décrites pour la première fois en 1984 [32], ces techniques utilisaient des sondes d'hybridations marquées. Les techniques de PCR proprement dites datent de 1990 et n'ont cessé d'évoluer depuis [33]. Les cibles de l'amplification sont nombreuses. Le gène codant pour la grande sous-unité de l'ARN ribosomal est conservé chez toutes les espèces plasmodiales. En revanche, l'amplification des gènes codant pour la petite sous-unité ribosomale ou du circumsporozoïte permet de différencier les quatre espèces [34,35]. De très nombreux autres gènes ont été utilisés [33]. Les techniques d'amplifications sont variées : PCR classiques, nichées ou semi-nichées, multiplex. La sensibilité et la spécificité sont proches de 100 %. Le seuil de détection est très bas, de 0,001 à 0,3 parasite par µl, selon les techniques et amorces employées. L'apparition de technique de PCR en temps réel [33,36] a permis d'obtenir un résultat en moins d'une heure. Certaines de ces techniques permettent par ailleurs une quantification de l'ADN parasitaire. L'utilisation de ces techniques nécessite un bon plateau technique et un personnel compétent et formé. Le coût est deux à trois fois supérieur aux autres techniques [33].

2. Application pratique

La dernière réunion de consensus [37] a rappelé que le diagnostic biologique du paludisme devait être microscopique. Cet examen doit être réalisable 24 heures sur 24, et permettre d'obtenir une réponse en moins de deux heures. Il est le seul qui objective de façon certaine la présence du parasite. La fréquence, dans le contexte du paludisme d'importation, de formes à faible parasitémie conduit souvent à réaliser en première intention une technique de concentration, goutte épaisse ou QBC™ Malaria Test. C'est la technique la plus rapide et la plus sensible. Son surcoût par rapport à la goutte épaisse est largement amorti par le gain de temps technique. Le frottis sanguin reste de toute façon indispensable pour déterminer l'espèce. Il permet en outre d'évaluer la parasitémie. Lorsqu'il est négatif, la parasitémie est éluée sur la goutte épaisse. Ces techniques doivent donc être parfaitement connues et maîtrisées. Une formation initiale mais aussi continue est donc indispensable. Des évaluations récentes ont montré que près de 30 % des laboratoires rendaient leurs résultats dans un délai supérieur à deux heures [38] et qu'encore 30 % des résultats étaient inexacts lors du Contrôle national de qualité en parasitologie [39]. Il est intéressant de noter que 30 % des diagnostics initiaux sont portés par des laboratoires non hospitaliers.

Les biologistes sont confrontés à plusieurs obstacles : difficulté de réalisation et de lecture de la goutte épaisse, difficulté à détecter les parasites sur le frottis de sujets pauciparasitémiques, difficulté à déterminer l'espèce devant un faible nombre de parasites observables. La difficulté est quelquefois augmentée par la prise antérieure de médicaments qui altèrent la morphologie des parasites. Il est donc logique de chercher une aide dans les techniques sans microscope.

Les tests antigéniques sont les plus accessibles et les moins coûteux. Leur utilisation est tellement facile que l'OMS en fait la promotion en zone d'endémie. Tout en étant consciente des limites du test, l'organisation a dû faire ce choix la main forcée devant la pénurie de microscopistes entraînés et fiables et devant le manque d'équipements utilisables.

La situation est différente dans notre contexte, mais la facilité d'utilisation des tests antigéniques en fait des auxiliaires précieux, notamment en cas de faible parasitémie. Lorsque le diagnostic est posé, il est parfois difficile d'affirmer ou d'infirmer la présence de *P. falciparum*. La présence de l'antigène est alors déterminante. Ce test est de plus en plus souvent pratiqué lorsque le lecteur n'est pas certain de son diagnostic. Il est très apprécié par les laboratoires qui voient rarement des échantillons positifs et par les biologistes ou techniciens de garde. Il convient toutefois de rappeler que ce test étant moins sensible (de l'ordre d'un facteur 10) que les méthodes de concentration, sa négativité ne permet pas d'écarter le diagnostic en cas de très faible parasitémie. Cela est vrai pour *P. falciparum* et encore plus pour les autres espèces où la sensibilité est moins bonne [40,41].

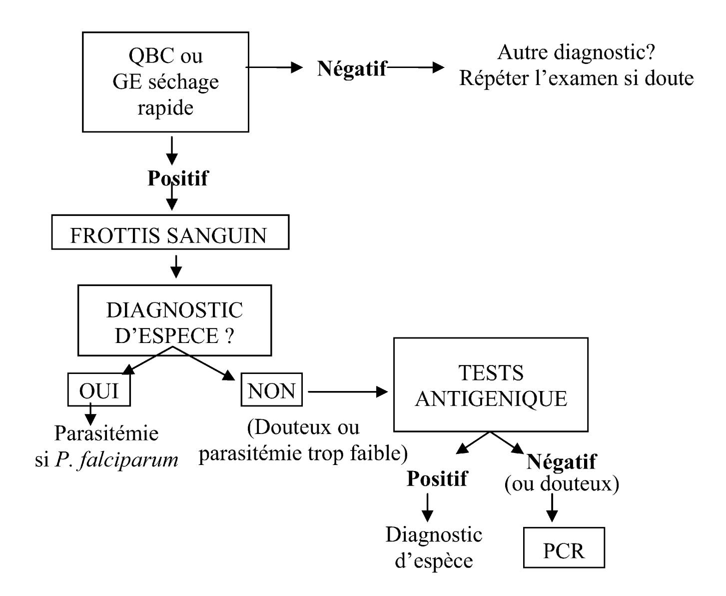
Le fait que l'antigène HRP2 puisse persister plusieurs jours après le traitement doit être connu. Ce caractère pourra être mis à profit pour faire un diagnostic rétrospectif chez un sujet encore fébrile, sans parasites visibles et ayant déjà pris des antipaludiques.

Les techniques de biologie moléculaire apportent quant à elles l'avantage d'une très grande sensibilité. Cependant, leurs contraintes de mise en œuvre font qu'elles ne peuvent être utilisées pour le diagnostic que dans les centres équipés et pendant les heures de service. Il est difficile d'envisager leur disponibilité pendant les gardes. Leur apport est donc souvent différé. Elles interviennent la plupart du temps comme tests de confirmation dans les cas d'interprétation difficile :

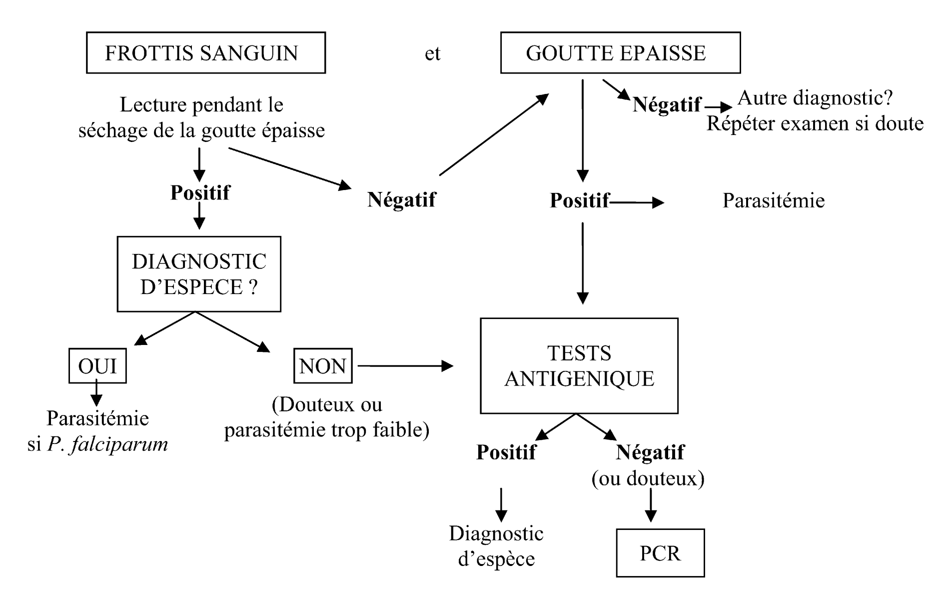
- détermination de l'espèce rendue difficile par une trop faible parasitémie ;
- techniques microscopiques et antigène négatif chez un sujet ayant pris des antipaludiques ;
- doute sur une association de plusieurs espèces ;
- contrôle de l'exactitude du diagnostic microscopique.

Comme toutes les techniques faisant appel à l'amplification génique, elles peuvent être négatives du fait de la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon [42].

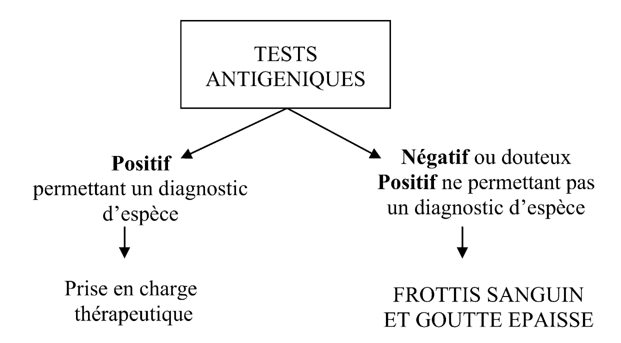
Dès lors, plusieurs algorithmes diagnostiques peuvent être proposés en fonction des moyens disponibles :



Algorithme 1. Présence du QBC TM Malaria Test ou technique de séchage rapide de la goutte épaisse.



Algorithme 2. Technique de séchage conventionnel de la goutte épaisse.



Algorithme 3. Microscopiste peu confirmé.

3. Conclusion

Quel que soit le laboratoire concerné, le diagnostic microscopique reste l'examen de première ligne. C'est un examen praticable 24 heures sur 24, donnant un résultat dans des délais compatibles avec l'urgence. Cela est d'autant plus vrai pour les laboratoires de référence ou ceux équipés d'un plateau technique de biologie moléculaire, qu'ils ont souvent la responsabilité de la formation des futurs biologistes et de nombreux techniciens. Pour les laboratoires où les biologistes se sentent peu à l'aise dans le diagnostic microscopique, les tests antigéniques pourraient représenter une alternative. La positivité de ces tests permettrait une prise en charge adéquate et rapide des patients. En revanche, leur négativité doit conduire à la réalisation immédiate d'un examen microscopique avec concentration des parasites.

Références

[1] Boutin JP, Pradines B, Pages F, Legros F, Rogier C, Migliani R. Épidémiologie du paludisme. Rev Prat 2005;55:833–40.

[2] Gilles HM, Warrel DA. Bruce-Chwatt's essential malariology. London: Edward Arnold ed; 1993 (340 p).

[3] World Health Organisation- Malaria. Eight report of the expert commitee. Geneva: WHO ed; 1961 (WHO Tech Rep Ser n° 243).

[4] Rogier C, Henry MC, Spiegel A. Diagnostic des accès palustres en zone d'endémie: bases théoriques et implications pratiques. Med Trop 2001; 61:27–46.

[5] Chevalier B, Cavallo JD, Baudet JM, Samson T, Gros P, Crenn Y, et al. Diagnostic rapide du paludisme. Le four à micro-ondes. Bull Soc Path Exo 1992;85:223–5.

[6] Raphenon G, Parzy D, Ndihokubwayo JB, Lecamus JL. Diagnostic parasitologique du paludisme par le test QBC : principe, mode d'emploi, applications. Feuill Biol 1993;34(191):21–30.

[7] Peyron F, Martet G, Vigier JP. Dipstick antigen-capture assay for malaria detection. Lancet 1996;1:1502–3.

[8] Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. Clin Microbiol Rev 2002;15:66–78.

[9] Rock EP, Marsh K, Saul SJ, Wellems TE, Taylor DW, Maloy WL, Howard RJ. Comparative analysis of the *Plasmodium falciparum* histidins-richs protein HRP1, HRP2, and HRP3 in malaria parasites of divers origin. Parasitology 1987;95:209–27.

[10] Hance P, Garnotel E, De Pina JJ, Vedy S, Ragot C, Chadli M, Morillon M. Tests immunochromatographiques rapides de détection du paludisme, principes et stratégies d'utilisation. Med Trop 2005;65:389–93.

[11] Laferi H, Kandel K, Pichler H. False-positive dipstick test for malaria. N Engl J Med 1997;337:1635–6.

[12] Humar A, Ohrt C, Harrington MA, Pillai D, Kain KC. ParaSight® F test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travellers. Am J Trop Med Hyg 1997;56:44–8.

[13] Dietz R, Perkins M, Boulos M, Luz F, Reller B, Corey CR. The diagnosis of *Plasmodium* using a new antigen detection system. Am J Trop Med Hyg 1995;52:45–59.

[14] Kilian AH, Mughusu EB, Kabagambe G, Von Sonnenburg F. Comparison of two rapid HRP-2 based diagnostic tests for *Plasmodium falciparum*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1997;91:666–7.

[15] Kodisinghe HM, Perera KL, Premawansa SD, Naotunne S, Wickramainghe AR, Mendis KM. The ParaSight® F test as a routine diagnostic tool for malaria in Sri-Lanka. Trans R Soc Trop Med Hyg 1997;91:398–402.

[16] Singh N, Saxena A, Valecha N. Field evaluation of the ICT Malaria P.f./P.v. immunochromatographic test for diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infection in forest villages of Chhindwara, central India. Trop Med Int Health 2000;5:765–70.

[17] Grobusch MP, Alpermann U, Schwenke S, Jelinek T, Warhurst DC. False-positive rapid test for malaria in patients with rheumoid factor. Lancet 1999;353:297.

[18] Laferi H, Kandel K, Pichler H. False-positive dipstick tests for malaria. N Engl J Med 1997;337:1635–6.

[19] Iqbal J, Sher A, Rab A. *Plasmodium falciparum* histidine rich protein-2 based immunocapture diagnostic assay for malaria: cross reactivity with rheumatoid factors. J Clin Microbiol 2000;38:1184–6.

[20] De Pina JJ, Morillon M, Parzy D, Garnotel E, Martet G. Paludisme à *Plasmodium falciparum* et recherche d'HRP2 négative. Une explication ? Med Trop 1997;57:413–4.

[21] Piper R, Lebras J, Wentworth L, Hunt Cooke A, Houze S, Chiodini P, Makler M. A capture diagnostic assay for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). Am J Trop Med Hyg 1999;60:109–18.

[22] Makler MT, Hinrichs DJ. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. Am J Trop Med Hyg 1993;48:205–10.

[23] Moody A, Hunt-Cooke A, Gabett E, Chiodini P. Performance of the OptiMAL® malaria antigen capture dipstick for malaria diagnosis and treatment monitoring at the Hospital for Tropical Diseases, London. Br J Haematol 2000;109:891–4.

[24] Piper RC, Vanderjagt DL, Holbrook JJ, Makler M. Malaria lactate dehydrogenase: target for diagnosis and drug development. Ann Trop Med Parasitol 1996;90:433.

[25] Mason DP, Kawamoto F, Lin K, Laoboonchai A, Wongsrichanalai C. A comparaison of two rapid field immunochromatographic tests to expert microscopy in the diagnosis of malaria. Acta Trop 2002;82:51–9.

[26] Tjitra E, Suprientos S, Dyer M, Currie BJ, Anstey NM. Field evaluation of the ICT Malaria P.f./P.v. immunochromatographic test for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plamodium vivax* in patients with presumptive clinical diagnosis of malaria in Eastern Indonesia. J Clin Microbiol 1999;37:2412–7.

[27] Farcas GA, Zhong KJ, Lovegrove FE, Graham CM, Kain KC. Evaluation of the Binax NOW ICT test versus polymerase chain reaction and microscopy for the detection of malaria in returned travellers. Am J Trop Med Hyg 2003;69:589–92.

[28] Hunt-Cooke A, Chiodini P, Doherty T, Moody A, Ries J, Pinder M. Comparison of a parasite lactate dehydrogenase-based immunochromatographic antigen detection assay (Optimal®) with microscopy for the detection of malaria parasites in human blood samples. Am J Trop Med Hyg 1999;60:173–6.

[29] Moody A, Hunt -Cooke A, Gabbett E, Chiodini P. Performance of the Optimal malaria antigen capture dipstick for malaria diagnosis and treatment monitoring at the Hospital for Tropical Diseases, London. Br J Haematol 2000;109:891–4.

[30] Bigaillon C, Fontan E, Cavallo JD, Hernandez E. Ineffectiveness of the Binax NOW Malaria test for diagnosis of *Plasmodium ovale* malaria. JCM 2005;43:1011.

[31] Grobush MP, Hanscheid T, Zoller T, Jelinek T, Burchard GD. Rapid immunochromatographic malaria antigen detection unreliable for detec-

ting *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002;21:818–20.

[32] Franzen T, Westin G, Shabo R, Aslund L, Perlmann H, Personn T, et al. Analysis of clinical specimens by hybridization with probe contening repetitive DNA from *P. falciparum*. A novel approach to malaria diagnosis. Lancet 1984;1:525–8.

[33] Berry A, Fabre R, Benoit-Vical F, Cassaing S, Magnaval JF. Contribution of PCR-based methods to diagnosis and management of imported malaria. Med Trop 2005;65:176–83.

[34] Kawamoto F, Miyake H, Kanrko O, Kimura M, Nguyen D, Lui Q, et al. Sequence variation in the 18S rRNA gene, a target for PCR-based malaria diagnosis in *Plasmodium ovale* from southern Vietnam. J Clin Microbiol 1996;34:2287–9.

[35] Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malarial spécies in field sample by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. Mol Biochem Parasitol 1993;58:283–92.

[36] De Monbrison F, Angei C, Staal A, Kaiser K, Picot S. Simultaneous identification of the four human *Plasmodium* species and quantification of *Plasmodium* DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction. Trans R Soc Trop Med Hyg 2003;97:387–90.

[37] 12° conférence de consensus thérapeutique anti-infectieuse de la Société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF). Prise en charge du paludisme d'importation à *Plasmodium falciparum*. HIA Bégin, Saint-Mandé- 14/04/1999.

[38] Danis M., Legros F., Fromage M., Maisonneuve P. Impact de la conférence de consensus sur le paludisme d'importation à *Plasmodium falciparum* : évolution des pratiques de diagnostic biologique. Enquêtes Afssaps–CNMRI. Journées nationales d'infectiologie. Juin 2001 Nantes.

[39] Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Annales du Contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale. *Annales parasitologie*. *Parasitologie 04PAR1* mai 2004.

[40] Bigaillon C, Fontan E, Cavallo JD, Hernandez E. Ineffectiveness of the Binax NOW Malaria test for diagnosis of *Plasmodium ovale* malaria. JCM 2005;43:1011.

[41] Grobush MP, Hanscheid T, Zoller T, Jelinek T, Burchard GD. Rapid immunochromatographic malaria antigen detection unreliable for detecting *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002;21:818–20.

[42] Minodier P, Noel G, Blanc P, Retornaz K, Garnier JM. Tests rapides de dépistage du paludisme. Arch Pediatr 2005;12:697–9.